

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/403092



PRIORITY DOCUMENT

REC'D	22 JUN 1998
WIPO	PCT

## Bescheinigung

Die Hoechst Aktiengesellschaft in Frankfurt am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Dictyocaulus viviparus Antigen zur Diagnose des Lungenwurmbefalls und zur Vakzinierung"

am 15. April 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 07 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. Dezember 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Kel

Aktenzeichen: 197 15 586.3

## Beschreibung

- Dictyocaulus viviparus Antigen zur Diagnose des Lungewurmbefalls und zur Vakzinierung.
- Die Erfindung betrifft ein Antigen aus den adulten Stadien des Lungewurms Dictyocaulus viviparus (im folgenden auch D. viviparus oder Dictyocaulus genannt) des Rindes, mit dem man immundiagnostisch Lungewurmbefall bei Rindern nachweisen kann. In einer Vakzine kann das Antigen Immunschutz gegen D. viviparus hervorrufen.

<sup>2</sup> Mschr. 76. - 476). Die Atmung wird, auch durch die in den oberen Atemwegen zu Obstruktionen führenden adulten Stadien, erheblich erschwert. Sichtbare Folgen der starken Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens sind verminderte Gewichtszunahmen oder gar Gewichtsverluste verbunden mit Wachstumsverzögerungen. Bisweilen verschlimmern sich die klinischen Symptome dramatisch und führen rasch <sup>5</sup> zum Tod.

Die Lungenwurmerkrankung der Rinder kann anhand der klinischen Symptomatik (G. Gräfner (1987) Monash. Vet. med. 42: 178-181) oder anhand der mit dem Kot ausgeschiedenen Larven diagnostiziert werden (J. Boch, R. Supperer (1992). Diese Möglichkeiten eignen sich vor allem für die Diagnose am Einzeltier, wenn eine starke Infektion vorliegt. Zu der modernen Massentierhaltung werden jedoch, basierend auf einer geeigneten Diagnostik, epidemiologische Voraussagen und Risikoeinschätzungen bezüglich des Ausbruchs einer Dictyocaulose in der fortgeschrittenen Weidesaison benötigt; d.h. in Surveys müssen viele, möglicherweise noch schwach infizierte Kälber mit einer sichereren, sensiblen Methode untersucht werden. Hierzu sind serologische Methoden geeignet (A. Bellmer, T. Schnieder, A.M. Tenter (1989) Proc. 13<sup>th</sup> Conf. Wild Ass. Adv. Vet. Parasit., S. 33, Berlin, 07.-11.08.1989). In Dictyocaulus viviparus identifizierte, isoliert und teilweise rekombinant dargestellte Antigene werden zur Serodiagnostik genutzt. Für die Heilbehandlung der Dictyocaulose können gegen adulte und juvenile Stadien wirksame Medikamente eingesetzt werden (z.B. Levamisol®). (Pro) Benzimidazole, **Netomine**®, Ivermectin®. Diese Präparate sind hochwirksam und können somit durch akute Lungenwurmerkrankungen bedingte Ausfälle meist verhindern (H. Mehlihorn, D. Düwel, W. Raether (1993) Diagnose und Therapie der Parasiten von Haus-, Nutz- und Heimtieren. 2. Aufl. Gustav Fischer Verlag, S. 223-227). Bei einer prophylaktischen/metaphylaktischen Behandlung lassen die Wirkstoffe aufgrund ihrer radikalen Wirkksamkeit möglicherweise die Auseinandersetzung des Parasiten mit dem Immunsystem des Wirtes und somit die Ausbildung und Aufrechterhaltung einer belastbaren (Teil) Immunität nicht zu. Die Tiere sind dann einer Infektion im zweiten Weidejahr ungeschützt ausgesetzt (COBS, D.E., S.R. Pitt, J. Förster, M. T. Fox (1987) Res. Vet. Sci. 43: 273-275).

Deshalb wird in letzter Zeit aus epidemiologischer Sicht immer häufiger eine

3 Immunisierung der Kälber der ersten Weidesaison gefordert, entweder durch geringgradige subklinische Infektion oder durch Vakzinierung. Zur Zeit steht nur

4 eine Lebendvakzine in Form röntgenattenuierter Larven zur Verfügung, die eine Lebendvakzine in Form röntgenattenuierter Larven zur Verfügung, die

5 Grundimmunität hervorruft, die durch weitere natürliche Infektion aufrecht erhalten werden muß (Mehlhorn H., et al., (1993)). Bei ungenügender Nachimmunisierung

6 über natürliche Infektion kommen gelegentlich bei plötzlicher, starker Exposition Durchbrüche mit Husten und Erkrankungen vor. Da die Vakzine selbst im

7 Kühlschrank nur etwa 3 Wochen haltbar ist, muß sie sorgfältig aufbewahrt und rasch eingesetzt werden. Dieses Procedere verbietet einen „flächendeckenden“

8 Einsatz; die Vakzine bleibt deshalb in erster Linie speziellen Endemiegebieten vorbehalten. Aufgrund der mangelnden Stabilität und Qualität ist die Entwicklung

9 definierter Vakzinen (Subunitvakzine) erforderlich. Es stellt sich nun die Aufgabe, die aufgeführten Nachteile der derzeitigen Vakzinierungsmethode durch

10 Bereitstellung eines neuen, vorteilhaften Impfstoffes zu beseitigen. Diese Aufgabe

11 wurde durch die vorliegende Erfindung gelöst.

12 Die Erfindung betrifft ein neues, immunogenes, natives Protein, genannt DV 17, welches aus adulten Würmern von *Dicyocoaulus viviparus* isoliert wurde. Seine

13 Immunogenität begründet sich vor allem dadurch, daß es nach subcutaner Applikation im Rind eine Antikörperantwort induziert, die dem Tier Immunschutz

14 verleiht. Ferner kann dieses Protein im ELISA zur retrospektiven Immundiagnose der Dicyocoaulose im Rind verwendet werden. DV 17 ist durch folgende physikalische Eigenschaften charakterisiert. Das Protein ist beständig in allen

15 verwendeten Puffern. Eine Verminderung der Immunreaktivität nach Tiefgefrierung (-85°C) des gereinigten Antigens konnte nicht festgestellt werden. Für Antigen DV 17 wurde unter Verwendung eines HPLC-Systems und einer Nucleosil C 18-Säule

16 (150 mm x 4.6 mm; 5 µ) eine Retentionszeit von 14 min. gemessen (Gradientenelution bestehend aus Aqua dest / 0.1 % TFA (= 0 % B) und Acetonitril / 0.1 % TFA (= 100 % B)). DV 17 hat im SDS-Polyacrylamidgel (Phastgel 8-25 %)

17 ein geschätztes Molekulargewicht von ca. 16500 dalton. Der isoelektrische Punkt von DV 17 liegt im Bereich von 5.3-5.9. Letztlich wurden nach Proteolyse mit Endopeptidase Lys C folgende Peptidsequenzen ermittelt:

1. Ser Glu Ser Leu Tyr Glu Lys (SEQ ID NO.: 1)

2. Met Met Asp Asn Phe Val Lys (SEQ ID NO.: 2)

3. Tyr Lys Asp Glu Asn Glu Phe Met Asp Ala (SEQ ID NO.: 3)

4. Tyr Asp Ile Pro Glu Gln Tyr Arg Glu Ile (SEQ ID NO.: 4)

5. Asp Ala Ile Glu Lys Tyr Glu Asp Ile Pro Glu Gln Tyr Arg Glu Ile (SEQ ID NO.: 5)

6. Phe His Ala Glu Leu Ala Gly Ile Lys (SEQ ID NO.: 6)

7. Pro Ser Leu Glu Leu Lys (SEQ ID NO.: 7)

8. Val Ala Glu His Leu Lys (SEQ ID NO.: 8)

9. Val Ala Glu His Leu Lys (SEQ ID NO.: 9)

10. Val Ala Glu His Leu Lys (SEQ ID NO.: 10)

b) die gemäß a) hergestellten Oligonukleotide radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden und

5 Als biologische Eigenschaft ist die Entwicklungshemmung von Dictyocaulus vivinarii im Rind nach Vakzination herausragend.

Die Erfindung hat daher zum Gegenstand ein immunogenes Protein mit protektiver Wirkung, welches aus adulten Würmern des *Lungenwurms Dictyocaulus viviparus* isoliert wird und welches bevorzugt ein Molekulargewicht von 15000-18000 Da, einen isoelektrischen Punkt zwischen 5,3-5,9 und Aminosäuresequenzen gemäß Tabelle 1 aufweist.

Ein vorzugsweiser Gegenstand der Erfinlung ist ein Protein, welches ein Molekulargewicht von  $16500 \pm 1500$  Da und / oder einen isoelektrischen Punkt von 5,6 hat.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins bei dem die Isolierung mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Extraktionsmethoden und chromatographischen Methoden durchgeführt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA, welche eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle oben beschrieben, vorzugsweise eine DNA, die eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 enthält.

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Isolierung der genetischen DNA, bei welchem

30 a) degenerierte Oligonukleotide, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon hergestellt werden,

b) die gemäß a) hergestellten Oligonukleotide radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden und

c) aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus *Dicyocoetus viviparus*, cDNA-Klone isoliert werden, die mit den in b) hergestellten Hybridisierungs-s-proben unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung der genannten DNA, bei welchem

- a) PCR-Primer, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon oder enthaltend eine Oligo-dT-Sequenz hergestellt werden.

b) mit den so erzeugten PCR-Primeren aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus *Dicyocaulus viviparus*, PCR-Fragmente generiert werden,

d) zur Vervollständigung der cDNA-Sequenz durch Hybridisierungsverfahren wie oben beschrieben an Stelle der degenerierten Oligonukleotide verwenden.

Das zuletzt beschriebene Verfahren kann auch so abgewandelt werden, daß für die PCR-Reaktion als Matrize RNA benutzt wird, die in einem zusätzlichen Schritt zunächst revers transkribiert und der so entstandene cDNA-Erststrang zur PCR verwendet wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein rekombinantes Protein, enthaltend Aminosäuresequenzen gemäß Tabelle 1, welches vorzugsweise durch Expression einer wie oben beschrieben erhaltenen cDNA in Prokaryonten oder Eukaryonten und Aufreinigung nach dem Fachmann bekannten Methoden erhältlich ist.

7 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein immunochemisches Verfahren unter Verwendung des oben beschriebenen Proteins von *D. viviparus*, mit welchem die Menge an DV 17 spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern bestimmt wird, indem man mit DV 17 beschichtete ELISA-Platten mit zu untersuchendem Rinderserum 10 inkubiert und gegebenenfalls gebildete DV 17 / Antikörper-komplexe durch Peroxidase-konjugierte, polyklonale Antikörper und eine entsprechende, dem Fachmann bekannte Farbreaktion nachweist.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des oben beschriebenen Proteins von *D. viviparus* als Vakzine, verbunden mit einem Carrier oder Adjuvans und ggf. Hilfsstoffen zur Immunisierung von Rindern gegen *Dictyocaulus*. Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Diagnostik-Kit, enthaltend das oben beschriebene Protein von *D. viviparus*. Schließlich ist ein Gegenstand der Erfindung eine Vakzine, enthaltend das oben beschriebene Protein von *D. viviparus* sowie einen Carrier, ein Adjuvans sowie ggf. Hilfsstoffe.

15 20 Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen näher erläutert, ohne darauf beschränkt zu sein. Die Tabelle ist wie folgt beschrieben:

Tabelle 1: Teilaminosäuresequenzen des isolierten DV 17-Proteins aus *Dictyocaulus viviparus* und die daraus ableitbare degenerierte Nukleotidsequenz. Abkürzungen:  
 $N = A, G, C, T; Y = T, C; H = A, C, T; R = A, G; M = A, C$

Für die Identifizierung von Protein DV 17 wurden Normalseren und Infektionsseren von Rindern verwendet, die mit gastrointestinalen Nematoden wie *Ostertagia ostertagi* und *Cooperia oncophora* sowie dem Lungewurm *Dictyocaulus viviparus* infiziert waren.

8 Chromatographisch aufgetrennte Proteinfraktionen gewonnen aus homogenisierten, adulten Lungewürmern wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelektrophorese weiter aufgetrennt und auf Immobilion P-Membranen immobilisiert (Semidry-Blotting). Das lungewurmspezifische Protein DV 17 wurde anschließend mit den spezifischen Infektionsseren detektiert und mittels Umkehrphasen-HPLC-Säule weiter aufgereinigt. Die Reinheit der Proteinfraktion wurde in silber-gefärbten SDS-Polyacrylamidgeleien (Phasigele) überprüft. Mittels BCA-Proteinassay wurde die Proteinkonzentration in elektrophoretisch reinen DV 17-Fraktionen bestimmt und bei -85°C tiefgefroren. Helminthennaive Rinder wurden 2 mal mit jeweils einer definierten Menge von gereinigtem DV 17 vakziniert. Die Rinder wurden 1 Woche nach der zweiten Vakzination mit L3-Larven von *Dictyocaulus viviparus* belastet (Challenge). Nicht vakzinierter Tiere dienten als Kontrolle. 4 Wochen nach dem Challenge wurden die Rinder geschlachtet, in der Lunge die Anzahl adulter Würmer bestimmt und die Länge der männlichen und weiblichen Würmer gemessen. Als Maß für den Immunenschutz wurde die Reduktion der Anzahl adulter Würmer im Vergleich zur nicht vakzinierter Kontrolle definiert.

9 „Stringente Bedingungen“ in Zusammenhang mit DNA-Hybridisierung bedeutet in der vorliegenden Anmeldung 6xSSC, 68°C.

10 15 20 25 30 Die PCR-Bedingungen sind nach jedem Fachmann bekannten Methoden in Vorversuchen zu bestimmen.

10 15 20 25 30 Beispiel 1: Herstellung von Infektionsseren Helminthennaive Rinder im Alter von 6 Monaten wurden mit unterschiedlichen Dosen von dritten Larven verschiedener Nematodenspezies (*Dictyocaulus viviparus*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*) infiziert. Die Infektions-dosen betragen in der *Dictyocaulus*-Gruppe 2500, 1250 und 500 Larven / Rind; je Dosis wurden 3 Tiere verwendet. Für die *Ostertagia*-Gruppe wurden Infektionsdosen von 70 000, 30 000 und 15 000 Larven / Rind gewählt. Neben einer nicht infizierten Gruppe (= Negativkontrolle) wurde zusätzlich eine gemischte Gruppe mitgeführt, in

9 der jedes Rind mit 2 500 Dictyocaulus Larven, 10 000 Ostertagia Larven und 10 000 Cooperia Larven infiziert wurde. An den Tagen D0 (= Tag der Infektion), D +21, D +40, D +56, D +70, D +84, D +98 und D +112 wurden von jedem Rind Serumproben gewonnen, die aliquotiert bei -25°C aufbewahrt wurden. Die Seren wurden zur Identifizierung des Dictyocaulusantigens DV 17 in elektrophoretisch, chromatographisch aufgetrennten Proteinfraktionen sowie zur Beurteilung der Spezifität verwendet.

10 Beispiel 2: Gewinnung adulter Lungenwürmer

6 Monate alte, helminthennaue Rinder wurden mit jeweils 5000 dritten Larven von Dictyocaulus viviparus oral infiziert; am darauffolgenden Tag erhielten die Tiere die gleiche Infektionsdosis. 28 Tage nach der Infektion wurden die Rinder geschlachtet und nach der Sektion adulte Würmer aus den Lungen gesammelt. Die Würmer wurden anschließend 3x mit phosphatgepufferten Kochsalzlösung gewaschen, gewogen und bei -85°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

20 Beispiel 3: Extraktion von DV 17 aus adulten Lungenwürmern

10 g gefrorene Wurmmasse wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit 40 ml 0.025 M Tris-HCl-Lösung pH 7.4 + 2 mM Pefabloc® im Gewebehomogenisator homogenisiert. Zur Entfernung grober Gewebe-bestandteile wurde das Homogenat bei 3010 g und 4°C 15 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde bei 4°C für 20 min bei 39 800 g zentrifugiert und der Überstand unter den gleichen Bedingungen 10 min rezentrifugiert. Der klare Überstand wurde nach Filtration mit 1.2 µm-Filtern in 1 Liter phosphatgepuffter Kochsalzlösung (PBS) über Nacht bei 4°C dialysiert (cut off der Dialysemembran 8000).

Beispiel 4: Präparative Gelfiltration

10 Der dialysierte Überstand wurde bei 39 800 g 15 min zentrifugiert und der klare Überstand im Pharmacia-FPLC-System mittels präparativer Gelfiltrationsäule (Säulentyp XK 16 / 60; Trennmedium: Superdex 75 prep grade, Säulenvolumen: 124 ml) aufgetrennt. Zur Elution wurde PBS pH 7.4 verwendet. Die Fraktionen mit den Retentionsvolumina 65 - 75 ml wurden gesammelt und mit Ultra-filtrationsmodulen (cut off 3000) aufkonzentriert. Mit einem amplifizierten Western Blot wurde Protein DV 17 nachgewiesen.

Beispiel 5: Western Blot-Analyse

15 Die aufkonzentrierte Superdex 75 prep grade-Fraktion wurde im Verhältnis 1:2 mit reduziertem SDS-Puffer gemischt; davon wurden jeweils 40 µl / Probenvertiefung auf ein SDS-Exzégeil (Fa. Pharmacia) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in der Multiphor II-Kammer (Fa. Pharmacia) unter standardisierten Laufbedingungen (607 V, 50 mA, 30 W, Laufzeit: 90 min) durchgeführt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels „Semidry-Blotting“ (Tovey ER, Baldo BA, Electrophoresis, 8, 1987, 384-387) auf Immobilon P-Membranen transferiert (Transferbedingungen: 45 min, konstante Stromstärke 0.8 mA / cm²) und nach einer 24 stündigen Blockphase mit 3 %igem Rinderserumalbumin in Tris gepuffelter Kochsalzlösung (TBS) mit einem Dictyocaulus-specifischen Immunserum (gewonnen am D +40, siehe Beispiel 1) in einer Verdünnung von 1:20 1 Stunde inkubiert. Als Negativ-kontrolle wurde 25 Rindernormalserum (Verdünnung 1:20 verwendet). Nach 3 maligem Waschen mit TBS + 0.05 % Tween 20 wurde die Blotfolie mit einem Biotin-markierten Ziege anti-Rind IgG (H+L) Antikörper (1:500; Fa. Pierce) für 1 Stunde inkubiert. Nach 3 maligem Waschen (TBS + 0.05 % Tween 20) erfolgte eine 1 stündige Inkubation mit dem Enzymkonjugat Biotin-Streptavidin-Alkalische Phosphatase (1:2500; Fa. Pierce). Die Substratentwicklung wurde mit dem Substratkit der Fa. Biocad durchgeführt.

## Beispiel 6: Umkehrphasen - HPLC

Nach der immunologischen Identifizierung von DV 17 in den präparativen Gefiltrationsfraktionen wurde das Protein mittels HPLC weiter aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde eine Nucleosil C 18 5U-Säule der Firma Altech verwendet (150 mm x 4.6 mm). Das Protein wurde mit Hilfe eines linearen Puffergradienten eluiert (Puffer A: Reinstwasser +0.1 % Trifluoressigsäure (TFA); Puffer B: Acetonitril + 0.1 % TFA). 500 µl der in Beispiel 4 aufkonzentrierten Fraktion wurden mit Puffer A:1:2 verdünnt und dann in die Säule injiziert. Die Flußrate betrug 0.5 ml / min. Die Gradientenelution wurde 5 min nach Injektion gestartet und 10 min später beendet. Für DV 17 wurde eine Retentionszeit von 14 min gemessen.

mit definiertem, isoelektrischem Punkt (pH 3.5 - 9.3 Fa. Pharmacia) mitgeführt. Es ergab sich ein isoelektrischer Punkt von 5.3 - 5.9.

5 Beispiel 6: Umkehrphasen - HPLC  
 Gefiltrationsfraktionen wurde das Protein mittels HPLC weiter aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde eine Nucleosil C 18 5U-Säule der Firma Altech verwendet (150 mm x 4.6 mm). Das Protein wurde mit Hilfe eines linearen Puffergradienten eluiert (Puffer A: Reinstwasser +0.1 % Trifluoressigsäure (TFA); Puffer B: Acetonitril + 0.1 % TFA). 500 µl der in Beispiel 4 aufkonzentrierten Fraktion wurden mit Puffer A:1:2 verdünnt und dann in die Säule injiziert. Die Flußrate betrug 0.5 ml / min. Die Gradientenelution wurde 5 min nach Injektion gestartet und 10 min später beendet. Für DV 17 wurde eine Retentionszeit von 14 min gemessen.

10 Teilaminoäuresequenzen identifiziert:

5 Beispiel 9: Aminosäuresequenzanalyse  
 Gemäß Beispiel 6 isoliertes DV 17 (40 µg) wurde mit Hilfe von Endopeptidase Lys C gespalten und die resultierenden Peptide mit einer C 18-Reserve Phase HPLC aufgereinigt. 7 Peptide wurden N-terminal ansequenziert. Es wurden folgende Teilaminoäuresequenzen identifiziert:

15 Beispiel 7: Reinheitsnachweis und Molekulargewichtsbestimmung  
 Die mittels HPLC aufgereinigte Fraktion mit einer Retentionszeit von 14 min wurde mit einem SDS-Polyacrylamidge (Phast SDS-Gel 8-25 %) im Phastsystem (Fa. Pharmacia) unter standardisierten Bedingungen analysiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Silver Stain SDS-PAGE Standards, low range“-Kit der Fa. Biorad verwendet. DV 17 wurde nach der Elektrophorese mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (Silverstain Kit, Fa. Pharmacia). Die Molekulargewichtsbestimmung wurde mit einem Videodensitometer (Molecular analyst, Fa. Biorad) mittels Auswertungsprogramm „Profile analyst II“ durchgeführt. Für DV 17 wurde ein Molekulargewicht von  $16\ 500 \pm 1\ 500$  dalton berechnet.

20 Beispiel 8: Bestimmung des isoelektrischen Punktes  
 Gemäß Beispiel 6 isoliertes DV 17 wurde mit Reinstwasser verdünnt und auf vorgefertigte Fokussiergele (IEF Phastgele pH 3 - 10, Fa. Pharmacia) aufge-tragen.

25 Die Fokussierung im Phastsystem erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Zwecks Bestimmung des isoelektrischen Punktes von DV 17 wurden Markerproteine

30

Beispiel 11: ELISA zum serologischen Nachweis einer Dictyocaulose

1				13					10	
5.	Asp	Ala	Ile	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asp	Ile	Pro
	Glu	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	Ile	Pro	Gln	Asn
5	Val	Ala	Glu	His	Leu	Leu	Lys			(SEQ ID NO.: 5)
	1			5					10	
6.	Phe	His	Ala	Glu	Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys
10	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Lys		(SEQ ID NO.: 6)
	1			5					10	
7.	Gln	Phe	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Val	Phe	Ser
15	Asn	Glu	Glu	Lys						(SEQ ID NO.: 7)

Beispiel 10: Nachweis eines protektiven Effekts von DV 17

20	5	Monate alte, helminthennaive Bullenkalber (Stallaufzucht, koproskopischer Nachweis negativ) wurden mit jeweils 50 µg gereinigtem, nativem DV 17 subcutan vakziniiert. 4 Wochen später erfolgte eine Boostervakzination mit 45 µg Antigen / Rind. Die Tiere wurden 1 Woche nach der 2. Vakzination mit jeweils 2 x 1000 L3-Larven von Dictyocaulus viviparus belastet (= Challenge). Nicht vakziniierte Tiere dienten als Kontrolle. 35 Tage nach dem Challenge wurden die Tiere geschlachtet und in der Lunge die Anzahl adulter Würmer bestimmt; gleichzeitig wurde die Länge intakter männlicher und weiblicher Würmer gemessen. In der vakziniierten Gruppe wurde eine um 80 % reduzierte Anzahl adulter Würmer gefunden. Adulte Würmer aus der vakziniierten Gruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kleiner (Reduktion 33 %).	25	1.	Ser	Glu	Ser	Leu	Tyr	Glu	Lys	(SEQ ID NO.: 1)
			TCN	GAR	UCN	YTN	TAY	GAR	AAR		(SEQ ID NO.: 8)	
30	2.	Met	Met	Asp	Asn	Phe	Val	Lys			(SEQ ID NO.: 2)	
		ATG	ATG	GAY	AAY	TTY	GTN	AAR			(SEQ ID NO.: 9)	

Tabelle 1

1	Tyr	Lys	Asp	Glu	Asn	Glu	Phe	Met	Asp	Ala	10	15	16	15	16	15	16	15	16
3.	TAY	AAR	GAY	GAR	AAY	GAR	TTT	ATG	GAY	GCN	(SEQ ID NO.: 3)	(SEQ ID NO.: 10)	(SEQ ID NO.: 13)	(SEQ ID NO.: 6)	(SEQ ID NO.: 14)	(SEQ ID NO.: 7)	(SEQ ID NO.: 10)	(SEQ ID NO.: 13)	(SEQ ID NO.: 14)
5	Leu	Lys	Gln	Lys															
10	YTN	AAR	CAR	AAR															
1	Tyr	Asp	Ile	Pro	Glu	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	10	15	20	15	20	15	20	15	20
10	TAY	GAY	ATH	CCN	GAR	CAR	TAY	MGN	GAR	ATH	(SEQ ID NO.: 4)	(SEQ ID NO.: 11)	(SEQ ID NO.: 11)	(SEQ ID NO.: 4)	(SEQ ID NO.: 11)	(SEQ ID NO.: 5)	(SEQ ID NO.: 12)	(SEQ ID NO.: 5)	(SEQ ID NO.: 12)
15	Ile	Pro	Gln	Asn	Val	Ala	Glu	His	Leu	Lys	20	25	30	20	25	20	25	20	30
20	Asp	Ala	Ile	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asp	Ile	Pro	10	15	20	10	15	20	10	15	20
25	GAY	GCN	ATH	GAR	AAR	TAY	GAR	CAY	YTN	AAR	(SEQ ID NO.: 12)	(SEQ ID NO.: 11)	(SEQ ID NO.: 11)	(SEQ ID NO.: 12)	(SEQ ID NO.: 11)	(SEQ ID NO.: 5)	(SEQ ID NO.: 12)	(SEQ ID NO.: 5)	(SEQ ID NO.: 12)
30	Phe	His	Ala	Glu	Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	10	15	20	10	15	20	10	15	20
6.	TTT	CAY	GCN	GAR	YTN	YTN	GCN	GGN	ATH	AAR	(SEQ ID NO.: 13)	(SEQ ID NO.: 14)	(SEQ ID NO.: 14)	(SEQ ID NO.: 13)	(SEQ ID NO.: 14)	(SEQ ID NO.: 7)	(SEQ ID NO.: 14)	(SEQ ID NO.: 7)	(SEQ ID NO.: 14)

## Patentansprüche:

1. Immunogenes Protein DV 17 mit protektiver Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein aus adulten Würmern des Lungenwurms *Dictyocaulus viviparus* isoliert wird. 5
2. Protein, gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein ein Molekulargewicht von  $15\ 000 - 18\ 000$  dalton, einen isoelektrischen Punkt zwischen 5,3 und 5,9 und Aminosäureteilsequenzen gemäß Tabelle 1 aufweist. 10
3. Protein, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein ein Molekulargewicht von  $16\ 500 \pm 1\ 500$  dalton hat. 15
4. Protein, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein einen isoelektrischen Punkt von 5,6 hat. 20
5. Verfahren zur Isolierung eines Proteins, gemäß einem der Ansprüche bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung mit Hilfe von Extraktionsmethoden und chromatographischen Methoden durchgeführt wird. 25
6. DNA, kodierend für ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4. 30
7. DNA, gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 enthält. 25
8. Verfahren zur Isolierung einer DNA gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß

b) die hergestellten Oligonukleotide radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden und

c) aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus *Dictyocaulus viviparus*, cDNA-Klone isoliert, die mit den nach b) hergestellten Hybridisierungs-proben unter stringenter Bedingungen hybridisieren.

9. Verfahren zur Isolierung einer DNA gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß

a) PCR-Primer, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon oder enthaltend eine Oligo-dT-Sequenz, hergestellt werden,

b) mit den so erzeugten PCR-Primern aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus *Dictyocaulus viviparus*, PCR-Fragmente generiert werden,

c) welche kloniert und nach gängigen Methoden analysiert werden und

d) zur Vervollständigung der cDNA-Sequenz durch Hybridisierungs-verfahren gemäß Anspruch 8 an Stelle der degenerierten Oligonukleotide verwendet werden.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß für die PCR-Reaktion als Matrize RNA benutzt wird, die in einem zusätzlichen Schritt zunächst revers transkribiert und der so entstandene Erstrang zur PCR verwendet wird.
11. Rekombinantes Protein, enthaltend Aminosäureteilsequenzen gemäß Tabelle 1.
12. Rekombinantes Protein, erhältlich durch Expression einer nach einem der Ansprüche 8 bis 10 erhaltenen cDNA in Prokaryonten oder Eukaryonten und Aufreinigung.

SEQUENZPOTOKOJI

13. Immunchemisches Verfahren zur Bestimmung der Menge von DV 17 spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern unter Verwendung eines Proteins, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß mit DV 17 beschichtete ELISA-Platten mit zu untersuchendem Rinderserum inkubiert werden und gegebenenfalls gebildete DV 17 / Antikörperkomplexe mit Peroxidase-konjugierten, polyklonalen Antikörpern und einer Farbreaktion nachgewiesen werden.

14. Verwendung eines Proteins, gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, 11 oder 12 als Vakzine verbunden mit einem Carrier oder Adjuvans und ggf. Hilfsstoffen zur Immunisierung von Rindern gegen Dictyokaulose.

15. Diagnostik-Kit enthaltend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 - 4, 11 oder 12.

16. Vakzine, enthaltend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 - 4, 11 oder 12 sowie einen Carrier ein Adjuvans sowie aaf, Hilfsstoffe

2	Tle Pro Gln Aan Val Ala Glu His Leu Lys <sup>3</sup>	
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..14		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..18		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..10		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..15		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..20		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 25:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..5		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 30:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..14		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 35:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..10		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 40:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..15		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 45:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..20		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 50:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 26 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein		
(B) LAGE: 1..26		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 55:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare		
(B) ART: Nukleinsäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon		
(B) LAGE: 1..21		
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 60:		
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:		
(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren		
(B) ART: Aminosäure		
(C) STRANGFORM: Einzel		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)		
(ix) MERkmale:		
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon		
(B) LAGE: 1..15		



THIS PAGE BLANK (USPTO)